 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.07.23 J South Med Univ, 2016, 36(7): 1004-1007

流行病学调查

表面活性蛋白-D rs3088308、rs721917位点基因多态性与矽肺易感性的关系

吴传文[1],张秀峰[1],刘 微[1],王宏丽[1],郝小惠[2],郭志义[2],郭灵丽[2],刘和亮[2]
华北理工大学[1]公共卫生学院,[2]医学实验研究中心,河北 唐山 063000

摘要:目的 探讨表面活性蛋白-D rs3088308与rs721917位点基因多态性与河南地区某铁矿男性接尘作业人员矽肺易感性的关系。**方法** 采用1∶1配对病例-对照研究方法,以确诊的125例矽肺病人为病例组,以健康接尘工人为对照组,按同年龄、同性别、同工种、相同累积接尘工龄进行配对,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测表面活性蛋白-D基因rs3088308与rs721917两位点基因型。**结果** SP-D rs3088308位点病例组T/T、T/A、A/A基因型频率分别为22.2%、71.2%、5.6%,T、A等位基因频率分别为58.8%、41.2%,对照组T/T、T/A、A/A基因型频率分别为17.6%、58.4%、24.0%,T、A等位基因频率分别为46.8%、53.2%,两组间基因型与等位基因频率分布的差异均有统计学意义(P<0.05),且病例组T/T、T/A基因型以及T等位基因频率均明显高于对照组,但rs721917位点基因型与等位基因频率在两组间分布的差异均无统计学意义(P>0.05)。**结论** SP-D rs3088308位点基因多态性可能与矽肺易感性有关联,而rs721917位点基因多态性可能与矽肺易感性无关。
关键词:矽肺;表面活性蛋白-D;基因多态性;易感性

Association of surfactant protein D gene polymorphisms at rs3088308 and rs721917 with susceptibility to silicosis

WU Chuanwen[1], ZHANG Xiufeng[1], LIU Wei[1], WANG Hongli[1], HAO Xiaohui[2], GUO Zhiyi[2], GUO Lingli[2], LIU Heliang[1, 2]
[1]Public Health School, [2]Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between polymorphisms of surfactant protein D (rs3088308 and rs721917) and the susceptibility to silicosis. **Methods** This case-control study included 125 silicosis patients and 125 individuals exposed to industrial dust but without silicosis (control group), who were strictly matched with the case group for age, gender, work type and cumulative length of dust exposure. The rs3088308 and rs721917 polymorphisms of surfactant protein-D were detected in all the participants using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The frequencies of T/T, T/A and A/A genotypes of surfactant protein-D rs3088308 locus were 22.2%, 71.2% and 5.6% in the case group, significantly different from the frequencies of 17.6%, 58.4% and 24.0% in the control group, respectively (P< 0.05). The frequencies of C/C, C/T and T/T genotypes of rs721917 locus were 17.6%, 56.8% and 25.6% in the case group, similar to the frequencies of 15.2%, 60.0% and 24.8% in the control group, respectively (P>0.05). **Conclusion** Surfactant protein-D rs3088308 polymorphism is significantly associated with silicosis, and the T allele may be a risk factor for silicosis in individuals exposed to industrial dust.
Key words: silicosis; surfactant protein D; gene polymorphism; susceptibility

矽肺是由于长期吸入含游离二氧化硅浓度较高粉尘所引起的以肺组织炎症反应及弥散性纤维化为主要病理改变的一种全身性疾病,该疾病仍然是目前国内外最严重的职业卫生问题,但其发病机制尚未完全阐明,且无理想治疗方法[1]。大量流行病学调查表明,某些基因多态性可能与矽肺易感性有关联[2-4],目前国内外尚未见报道表面活性蛋白-D基因(SP-D)多态性与矽肺的相关性。本课题组前期动物实验结果表明[5],矽肺模型组大鼠肺组织SP-D表达量明显高于对照组,该结果提示,SP-D可能参与了矽肺的发生发展过程。此外,最新研究表明[6-7],SP-D rs3088308与rs721917两位点突变会导致人群基因表达水平的改变,结果可能影响疾病的发病风险。本研究旨在探讨SP-D rs3088308与rs721917两位点单核苷酸多态性作为矽肺易感人群早期筛选生物标志物的可行性,以便为矽肺防治提供一定的理论依据及实验室数据。

收稿日期:2016-03-12
基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(092761100D);唐山市国际科技合作项目(14160201B)
作者简介:吴传文,硕士研究生,E-mail: 944876793@qq.com
通信作者:刘和亮,教授,硕士生导师,E-mail: liuheliang@ncst.edu.cn

1 对象和方法

1.1 对象

选取河南省平顶山市某铁矿接矽尘作业人员为研究对象;以125例根据《尘肺病诊断标准》

(GBZ270-2009)确诊的Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期矽肺病例为病例组;按同年龄、同性别、同工种、相同累积接尘工龄进行配对,选择符合条件的125例健康接尘工人为对照组。所选研究对象均为汉族男性,且无血缘关系及其他心、肝、脾、肺、肾等部位的重大疾病,所有研究对象均签署了知情同意书,并且该研究获得了医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查及样本采集 采用调查问卷以面对面询问的方式收集研究对象基本资料,内容包括一般情况、吸烟饮酒情况、既往病史、职业病诊断史、工作单位、工作车间、工种(爆破工、挖掘工、钻工等)、工龄、接矽尘年限、职业防护等。现场采集研究对象空腹肘静脉血5 mL,加入EDTA抗凝管,用于提取基因组DNA,检测SP-D基因型。

1.2.2 试剂和仪器 DNA提取试剂盒(北京博迈德生物技术公司),引物合成(Invitrogen公司),2×MasterMix(北京博迈德生物技术公司),限制性内切酶MnlI、HpyCH4 IV(NEB公司),PCR扩增仪、电泳仪、凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2.3 基因型检测

1.2.3.1 DNA提取 采用小量全血基因组DNA提取试剂盒提取抗凝全血DNA。

1.2.3.2 PCR扩增体系及条件 25 μL反应体系包括:2 μL模板,浓度为10 μmol/L的上、下游引物各0.5 μL,2×MasterMix12.5 μL,补足超纯水至25 μL。反应条件:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性20 s、退火30 s、72 ℃延伸1 min为1个循环,共扩增35个循环,最后于72 ℃延伸10 min。rs3088308与rs721917两位点引物序列、退火温度及PCR扩增产物见表1。

表1 rs3088308与rs721917两位点PCR扩增引物序列、退火温度及扩增产物

Tab.1 Primer sequences, annealing temperatures and PCR products of the two SNPs

SNP ID	Primer pairs	Annealing temperatures	PCR product
rs3088308	5'-ACGGAGGCACAGCTGCTG-3'	56 ℃	115 bp
	5'-GGAAAGCAGCCTCGTTCT-3'		
rs721917	5'-CCCCATAGCAGAGGACAGAA-3'	60 ℃	238 bp
	5'-CCAGGGTGCAAGCACTGGAC-3'		

1.2.3.3 酶切反应体系及条件 25 μL反应体系包括:PCR扩增产物10 μL,限制性内切酶0.5 μL,10×缓冲液2.5 μL,补足超纯水至25 μL。反应条件:37 ℃水浴反应15 min。酶切反应结束后,取10 μL酶切产物,在12%聚丙烯酰胺凝胶中120 V电压条件下电泳40 min,EB溶液染色20 min,于凝胶成像系统下观察,根据条带数(与DNA Marker对照)分别确定SP-D基因两个单核苷酸多态性位点的基因型。

1.3 统计学分析

采用Excel软件建立数据库,用SPSS17.0统计软件对数据进行统计分析,选用拟合优度χ^2检验分析基因型频率分布是否符合Hardy-Weinberg遗传平衡,计量资料以均数±标准差表示,计数资料以百分率表示,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本情况

125例矽肺病例均为汉族男性,年龄为42~85岁,平均年龄为53.8岁,平均工龄为27.9年,发病年龄为31~72岁,平均发病年龄为50.3岁。工种构成情况为凿岩工占35%,爆破工占21%,成型工占26%,辅助工(包括车间机修、维修、检验、车间司机等)占18%。对照组125例均为汉族男性,年龄为41~86岁,平均年龄为53.3岁,工龄为9~35年,平均工龄为27.3年。对照组与病例组一一配对,工种构成相同,两组间吸烟、饮酒状况的分布差异均无统计学意义($P>0.05$,表2)。经χ^2检验,对照组两位点基因型频率分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡($P>0.05$),说明样本群体代表性良好。

2.2 SP-D-rs3088308与rs721917位点基因型与等位基因频率在病例组与对照组的分布

SP-D-rs3088308位点基因型与等位基因频率在病例组与对照组间分布的差异均有统计学意义($P<0.05$),且病例组T/T、T/A基因型以及T等位基因频率均明显高于对照组,但rs721917位点基因型与等位基因频率在两组间分布的差异均无统计学意义($P>0.05$,表3,4)。

3 讨论

尘肺是我国目前最严重的职业卫生问题,近几年平均每年新发尘肺病例已超过2万例,其中矽肺患者大约占上述病例的一半左右[8]。环境粉尘暴露是矽肺发生的直接病因,但接矽尘作业人员在同样粉尘暴露条件下,有些工人患病而有些工人却不患病,此现象提示,矽

表2 研究对象基本特征

Tab.2 Characteristics of the subjects enrolled

Characteristic	Control group	Silicosis	*P*
Nationality	Han	Han	
Subjects (*n*)	125	125	
Gender	male	male	
Age (*Mean*±*SD*, year)	53.3±9.6	53.8±8.5	0.82
Smoking status (*n*)	65 (Yes), 60 (No)	69 (Yes), 56 (No)	0.58
Drinking status (*n*)	42 (Yes), 83(No)	45 (Yes), 80 (No)	0.63
Working years (*Mean*±*SD*, years)	27.3±6.8	27.9±5.2	0.69

表3 rs3088308与rs721917位点基因型频率分布结果

Tab.3 Genotypic frequencies of rs3088308 and rs721917 in the two groups (*n*=125)

Group	rs3088308 *n* (%)			rs721917 *n* (%)		
	T/T	T/A	A/A	T/T	T/ C	C/C
Control	22（17.6）	73（58.4）	30（24.0）	19（15.2）	75（60.0）	31（24.8）
Silicosis	29（22.2）	89（71.2）	7（5.6）	22（17.6）	71（56.8）	32（25.6）
	χ^2=7.752	*P*<0.05		χ^2=1.265	*P*>0.05	

表4 rs3088308与rs721917位点等位基因频率分布结果

Tab.4 Allele frequencies of rs3088308 and rs721917 in the two groups (*n*=125)

Group	rs3088308 *n*（%）		rs721917 *n*（%）	
	T	A	T	C
Control	117（46.8）	133（53.2）	113（45.2）	137（54.8）
Silicosis	147（58.8）	103（41.2）	115（46.0）	135（54.0）
OR	1.652		0.782	
95%CI	1.183-2.136		0.59-1.45	

肺的发生不仅与环境因素有关，还在一定程度上受到遗传因素的影响。本研究拟探讨SP-D rs3088308与rs721917位点基因多态性与河南省某铁矿汉族人群矽肺易感性的关系。

表面活性物质对维持肺组织的正常功能具有重要作用，其组分包括磷脂与肺表面活性蛋白，肺表面活性蛋白包括SP-A、SP-B、SP-C、SP-D四种。SP-D属于钙依赖性C型凝集素家族成员，SP-D基因位于人类10号染色体q22.2-23.1，包括8个外显子，其表达产物SP-D由4个亚单位所构成，主要由肺泡Ⅱ型上皮细胞合成，其在肺部防御与先天性免疫方面发挥着十分重要的作用[9]。此外，皮肤、唾液腺、小肠粘膜、泌尿道上皮等部位也有少量表达[10]。目前，国内外相关研究表明，其与肺部多种疾病的发生有关，并且可能是某些肺部疾病的合适生物标志物[11-12]。本课题组前期动物实验探讨了SP-D作为矽肺早期筛查生物标志物的可行性，结论与闫立成等[13]的人群调查研究一致。最近研究表明[14-17]，SP-D基因某些位点的突变与慢性阻塞性肺疾病、急慢性肺损伤、婴儿呼吸系统窘迫综合征、二型糖尿病等疾病的发生均有关联。本研究探讨了SP-D rs3088308与rs721917位点的突变是否会改变矽肺的发病风险。结果表明，rs3088308位点病例组T/T、T/A 、A/A基因型频率分别为22.2%、71.2%、5.6%，T/T、T/A基因型频率高于对照组，而A/A基因型频率低于对照组，差异有统计学意义（*P*<0.05），并且病例组T等位基因频率为58.8%，也高于对照组的46.8%，计算T等位基因相对于A等位

基因的OR值为1.652,其95%CI为1.183-2.136。以上结果提示,rs3088308位点的单核苷酸多态性可能与矽肺的发生有关联,携带T等位基因人群矽肺发病风险会增加。Shakoori等[7]的研究发现该位点的多态性与慢性阻塞性肺疾病的易感性也有关联,但Liu等[18]却认为该位点的多态性与女性尿路感染无关,但与机体血清中SP-D浓度有关联。另外,本研究所选样本人群该位点各基因型频率的大小与其也有差异,可能不同种族与地区人群的遗传基因存在一定区别,这与Cheng等[19]的结论一致。但rs721917位点基因型与等位基因频率在两组间分布的差异均无统计学意义(P>0.05),本研究尚未发现该位点的突变与矽肺易感性有关联。最近,国内朱亚非等[20]的研究却发现该位点单核苷酸多态性与毛细支气管炎的易感性有关联。

本研究或许还具有一定的局限性,首先,该研究属于小样本的病例-对照研究,其论证因果关联的强度有限。今后考虑继续开展大样本病例对照研究甚至前瞻性队列研究来对以上结论作进一步验证。另外,本课题组还计划比较SP-D基因各基因型人群mRNA以及蛋白表达水平,期望从分子水平来阐明基因多态性改变疾病发病风险的具体机制。

综上所述,SP-D rs3088308位点基因多态性与矽肺发生有关联,T等位基因可能会增加人群矽肺发病风险,但尚未观察到rs721917位点基因多态性与矽肺发生有关联。

参考文献:

[1] Rosner D. The long struggle to protect workers' lungs against silicosis[J]. Milbank Q, 2014, 92(2): 191-4.

[2] Li Z, Xue J, Yan S, et al. Association between tumor necrosis factor-α 308G/A gene polymorphism and silicosis susceptibility: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76614.

[3] Corbett EL, Mozzato-Chamay N, Butterworth AE, et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(5): 690-3.

[4] Fang GF, Fan XY, Shen FH. The relationship between polymorphisms of interleukin-4 gene and silicosis [J]. Biomed Environ Sci, 2011, 24(6): 678-82.

[5] 王宏丽, 郝小惠, 白玉萍, 等. 矽肺大鼠血清中硅元素及表面活性蛋白-D的变化及意义[J]. 工业卫生与职业病, 2013, 39(1): 1-4.

[6] Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, et al. Differences in serum SP-D levels between German and Japanese subjects are associated with SFTPD gene polymorphisms[J]. BMC Med Genet, 2014, 15: 4.

[7] Shakoori TA, Sin DD, Bokhari SN, et al. SP-D polymorphisms and the risk of COPD[J]. Dis Markers, 2012, 33(2): 91-100.

[8] 钟学飘, 朱志良, 马 争, 等. 2005-2013年全国职业病发病情况分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(7): 858-9.

[9] Christensen AF, Sørensen GL, Hørslev-Petersen K, et al. Circulating surfactant protein -D is low and correlates negatively with systemic inflammation in early, untreated rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(2): R39.

[10] Madsen J, Kliem A, Tornoe I, et al. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues [J]. J Immunol, 2000, 164(11): 5866-70.

[11] 孟庆雪, 刘玉芬, 刘 静, 等. 肺表面活性蛋白研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3): 178-81.

[12] Ishii T, Hagiwara K, Kamio K, et al. Involvement of surfactant protein D in emphysema revealed by genetic association study[J]. Eur J Hum Genet, 2012, 20(2): 230-5.

[13] 闫立成, 曹福源, 赵海鹰, 等. 肺表面活性蛋白作为矽肺患者早期生物标志物的研究[J]. 现代预防医学, 2015, 42(9): 1562-3, 1566.

[14] Kim DK, Cho MH, Hersh CP, et al. Genome-wide association analysis of blood biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(12): 1238-47.

[15] Thomas NJ, Diangelo S, Hess JC, et al. Transmission of surfactant protein variants and haplotypes in children hospitalized with respiratory syncytial virus[J]. Pediatr Res, 2009, 66(1): 70-3.

[16] Silveyra P, Floros J. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 407-29.

[17] Pueyo N, Ortega FJ, Mercader JM, et al. Common genetic variants of surfactant protein-D (SP-D) are associated with type 2 diabetes [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60468.

[18] Liu J, Hu F, Liang W, et al. Polymorphisms in the surfactant protein a gene are associated with the susceptibility to recurrent urinary tract infection in Chinese women[J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 221 (1): 35-42.

[19] Cheng Y, An B, Jiang M, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and risk of coronary artery disease in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepat Mon, 2015, 15(3): e26818.

[20] 朱亚非, 方妍彤, 梁振明, 等. 肺表面活性蛋白D基因多态性与RSV毛细支气管炎的关系[J]. 中华全科医学, 2014, 12(9): 1370-2, 1430.

(编辑:经 媛)